

## **I. A kutatás célja**

Ma már általánosan elfogadott, hogy a májban is találhatóak olyan primitív sejtek, melyek képesek hepatocytákká és epeút hámsejteké differenciálódni. Ezek a máj őssejtek azonban különböznek a klasszikus hemopoeticus vagy epidermalis őssejtektől, ugyanis ezek az ún. fakultatív hepaticus őssejtek nem vesznek részt a mindennapos sejtpótlásban, csak akkor aktivizálódnak, ha valami megakadályozza a hepatocytákat az osztódásban. Az egyik legelterjedtebben használt kísérleti rendszer az őssejtek aktivizálásának és az utódsejtek viselkedésének tanulmányozására a 2 Acetaminofluorénnel (AAF) történő kezelés és partiális hepatectomia (Ph) kombinálásából álló ún. AAF/Ph kísérlet. Ennek során viszonylag szinkronizáltan nagy számban jelennek meg a kísérleti patkányok májában az őssejtek utódai az ún. ovális sejtek és differenciálódnak hepatocytákká. Mi is ezt a kísérleti rendszert alkalmaztuk a hepaticus őssejtek differenciálódásának vizsgálatára.

A májban a Hering csatornákat felépítő sejtek alkotják az őssejt populációt. Sajnos ezek a képletek nem azonosíthatók egyértelműen hagyományos szövettani metszeteken. Kísérleteinkben célul tűztük ki olyan immunfenotípus marker találását, mely megkönnyíti ezeknek a képleteknek az azonosítását és vizsgálatát.

Az elmúlt négy évben fő célkitűzésünk az ovális sejtek differenciálódásának vizsgálata volt. Immunhisztokémiai módszerekkel sikerült jellemezni a folyamatot és bebizonyítottuk, hogy a differenciálódás folyamata külső beavatkozással befolyásolható, felgyorsítható. Ez a megfigyelés potenciálisan a klinikumban is alkalmazható módszer kifejlesztéséhez is vezethet.

A pályázat indulásakor nagyon ígéretesnek tűntek azok a próbálkozások, melyek csontvelő őssejteket igyekeztek májsejteké differenciáltatni. Az ilyen irányú próbálkozásaink nem hoztak sikert összhangban az ilyen kísérleteket általánosan kísért kiábrándultsággal.

További munkáinkban megvizsgáltuk, hogy az „őssejt markernek” tekinthető AFP expresszió véletlenszerűen figyelhető-e meg a humán májrákok egy csoportjában. Illetve, hogy a humán májakban gyakran előforduló ún. ductularis reakció minden esetben őssejt eredetű reakciónak tekinthető-e?

## **II. Eredmények**

### *A cytokeratin 19+/7- fenotípus jellemző a patkány máj őssejtekre*

Az intermedier filamentumok legnagyobb családját a citokeratinok alkotják, melyeknek több mint 20 altípusa ismert. Ezeknek az altípusoknak az expressziója jellemző a különböző sejtípusokra. Több szövetben az őssejteket jellegzetes citokeratin expressziójuk alapján sikerült azonosítani. Ezért célzottan megvizsgáltuk az epeúthámsejtek citokeratin összetételét patkánymájban. A Hering csatornáknak megfelelő legkisebb epeútagak konzekvensen CK19+/7- nak bizonyultak szemben a nagyobb epeutak CK 19+/7+ fenotípusával. AAF kezeléssel, ami korábbi eredményeink alapján az őssejt kompartment aktivizálását jelenti, preferenciálisan a CK19+/7- sejtek proliferálását lehetett előidézni, ugyanakkor az epeutak általános proliferációs stimulusának tekinthető epeút lekötéssel ez a preferenciális osztódás nem volt előidézhető. Ebből arra következtettünk, hogy a CK19+/7- fenotípus a máj őssejtek sajátossága patkányokban. Sajnos ez a fenotípus nem stabil, mert az oválsejtes proliferáció későbbi stádiumaiban az ovális sejtek átmenetileg alacsony szinten bár, de CK7 –t termelnek. A CK19+/7- ductulusok részletes morfológiai elemzésével sikerült megfigyelnünk, hogy a Hering csatornák az eddig ismerteknél sokszor jóval hosszabb, gyakorta kanyargós, elágazódó csövecskéket alkotnak, melyek azonban sohasem lépik át a limiting plate-t és nem jelennek meg intralobularisan a hepatocyták között. Ez különbözik az emberi máj szerkezetétől, további különbség, hogy az ép emberi májban nem sikerült CK7- ductulusokat

azonosítanunk. A CK7- ductulusokat vizsgálva az egyedfejlődés során leírtuk, hogy ez a fenotípus még nincs jelen a májban a születés idején kb. 14 napos korban jelenik meg. Ez arra utalhat, hogy a máj őssejtek nem az egyedfejlődés során visszamaradt primitív sejtek, hanem aktív folyamat eredményeként jönnek létre. (Hepatology 42:863-870,2005)

#### Az ovális sejtek differenciálódásának jellemzése

Ellentmondásos adatok jelentek meg az AAF dózis differenciálódást befolyásoló hatásáról az AAF/Ph kísérleti rendszerben. Ezért megvizsgáltuk különböző AAF dózisok hatását a kísérlet kimenetelére. Előzetes kísérletek során megfigyeltük, hogy az ovális sejtek differenciálódásának időbeli és térbeli megoszlása valóban függ az alkalmazott vegyszer dózistól. Az előkísérletek alapján beállítottunk egy alacsony és egy magas dózisú kísérleti modellt és a továbbiakban részletesen jellemeztük ezeket. Az alacsony dózisú modellben az ovális sejtek hamarabb alakultak át hepatocytákká. A differenciálódás szinkronizáltan szinte valamennyi ovális sejtet érintette anélkül, hogy elrendeződésük megváltozott volna, azaz az új, kis hepatocyták is tubulusszerűen sorokba rendezettek voltak. Nagyobb dózisú AAF kezelést követően a differenciálódás jelei csak később lehetett megfigyelni és a májban elszórtan alakultak ki monoklonális eredetűnek tűnő focusok, melyek között azonban változatlanul sok ovális sejt is jelen volt, tehát az átalakulás nem érintette mindegyiküket. Celluláris szinten a két eltérő differenciálódási folyamatban azonos elváltozások voltak megfigyelhetők. Először a differenciálódó sejtek magjában megjelent a HNF-4 transcriptios faktor és a sejtek körül degradálódott a bazális membrán. Ezt követően hirtelen átmeneti fokozatok nélkül lehetett megfigyelni a biliaris fenotípus markerek (OV-6, AFP,  $\alpha 6$  integrin, Connexin 43) eltűnését és a hepatocytá specifikus tulajdonságok ( $\alpha 1$  integrin, Cx 32, polarizált CD26) megjelenését. (Hepatology 39:1353-1361, 2004)

#### Trijódtironin felgyorsítja az ovális sejtek hepatocytákká történő differenciálódását.

Az ún. primer hepatocytá mitogének előzetes májpusztulás nélkül is jelentős hepatocytá hyperplasiát képesek előidézni. Ha AAF/Ph protokollal kezelt állatoknak adtunk primer mitogéneket (trijódtironint (T3) vagy ólomnitrátot a hepatocyták nem voltak képesek a sejtciklusba lépni (az AAF DNS-hez való kötődése miatt). Ehelyett az ovális sejtek mitotikus aktivitásának fokozódását lehetett megfigyelni, amit nagyon gyorsan, a kezelést követő 48 órán belül az ovális sejtek jelentős részének hepatocytá irányú differenciálódása követett. A differenciálódást részletesen a T3 kezelést követően jellemeztük: (1) Immunhisztokémiai módszerrel a fentebbi pontban leírtakhoz hasonló változásokat figyeltünk meg. Az ovális sejtes fenotípus markerek (AFP, OV6, basális membrán) eltűnését, a hepatocytá markerek (HNF-4, Cx 32, CD26, Cytochrom P450) megjelenését lehetett észlelni. (2) A kontroll ovális sejtek és a differenciált új hepatocyták microdissectioját követően valós idejű, kvantitatív PCR módszerrel is az AFP mRNS expresszió csökkenését, a hepatocytákra jellemző albumin, triptofán oxigenáz, tirozin aminoszferáz expressziójának fokozódását mutattuk ki. (3) A hormonkezelt állatok szérumban a bilirubin szint szignifikáns csökkenését ill. a máj szintetikus funkcióját tükröző protrombin szint emelkedését lehetett megfigyelni, jelezve, hogy a differenciálódásnak szervezet szintjén is észlelhető májfunkció javulás volt a következménye. Annak igazolására, hogy a májban hirtelen megjelenő „kis” hepatocyták valóban az ovális sejtekből származnak, az ovális sejteket a hormonkezelés előtt retrovírussal „jelöltük meg”, a jelzés később a kis hepatocytákban volt fellelhető. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a máj őssejtek részvételével zajló regenerációja felgyorsítható. Ez a megfigyelés elvi háttérül szolgálhat a klinikai gyakorlatban pl. fulmináns májelégtelenségben a regeneráció felgyorsítására irányuló próbálkozásokhoz.

A munka közlésre való előkészítés fázisában van. **Kérem, hogy a jelentésben foglaltak alapján készült minősítést az OTKA később kiegészítő eljárásban módosítsa, figyelembe véve később megjelent közleményeinket.**

*A transzdifferentiálódás jelentősége májsejtek genezisében*

Jelen pályázat kezdeti időpontjában a kísérletes máj kutatások egyik legizgalmasabb és legígéretesebb területe a csontvelői őssejtek hepatocytákká történő átalakulása ún. transzdifferentiálódása volt. Ha ez a folyamat reprodukálhatónak bizonyult volna és beváltotta volna a hozzá fűzött reményeket számos májbetegség- elváltozás kezelésében jelenthetett volna komoly előrelépést. Ilyen irányú kísérletek a benyújtott pályázatban is fontos szerepet töltöttek be. A transzdifferentiálódás jelenségét a DPPIV negatív (mutáns) Fisher F344 patkányvonal segítségével szerettük volna vizsgálni (Laconi E és mtsai. Am J Pathol 153:319-329, 1998). Sajnos ez a Fisher mutáns patkány kereskedelmi forgalomban nem kapható és csak a pályázati periódus második felében sikerült beszerezni. Három a pályázatban leírt kísérletet végeztünk, de csontvelő eredetű hepatocytát egyik esetben sem sikerült találnunk. A további kísérletektől azért tekintettünk el, mert a területen egyre inkább a kiábrándultság uralkodott el és a témában készült összefoglaló közlemények mindegyike úgy foglalt állást, hogy a transzdifferentiálódás jelensége ha egyáltalán előfordul hepatocyták vonatkozásában akkor is egy nagyon ritkán lejátszódó folyamat, mely nem képes jelentős mértékű hepatocytá pótlásra (Mechanisms of Dev. 120: 117-130, 2003; Seminars in Liv Dis 23:363-371, 2003; Hepatology 43:2-8, 2006).

Ehhez a kérdéskörhöz csatlakozik következő kísérletünk. A transzdifferentiálódás elméleti megalapozásában fontos mérföldkő volt az a közlemény mely egy csontvelői őssejt marker a Thy-1 (CD90) expresszióját írta le ovális sejtekben (Hepatology 27:433-445, 1998). Ezen cikk nyomán sokan használták a Thy-1 antitestet az ovális sejtek jellemzésére, izolálására FACS-szal. Az AAF/Ph kísérleti rendszerben megvizsgáltuk konfokális és immunelektronmikroszkópiával a Thy-1 expressziót és az antigént nem az ovális sejtek felszínén, hanem az azokkal szoros közelségben levő myofibroblastokon (stellát sejteken) lehetett kimutatni. A perfúzióval izolált ovális sejtekből nyert RNS-ben kimutatható volt az AFP, de nem a Thy-1 mRNS, holott a teljes nem parenchymális frakcióból izolált RNS-ben kimutatható volt a Thy-1 mRNS. Tehát egy másik módszerrel is sikerült alátámasztani, hogy a csontvelői őssejt marker nem az ovális sejtek sajátja.

*Tioacetamid indukálta májfibrosis vizsgálata TGFβ-1 transzgén egereken.*

Tioacetamiddal indukáltunk májfibrosist olyan egerekben, melyek a májukban egy albumin promotor által irányított transzgénről fokozott mértékben termeltek TGFβ-1-t. A transzgén egerekben, a vad típushoz hasonlítva gyorsabban alakult ki máj fibrosis/cirrhosis, a regresszió mértéke viszont lassúbb volt, sőt a kísérlet végére sem állt vissza a szabályos májszerkezet. Mivel a májcirrhosis emberekben többnyire irreversibilis folyamat, a transzgén egerek viselkedése jobban hasonlít a humán megbetegedéshez. Véleményünk szerint ez a kísérleti rendszer alkalmasabb a humán fibrotikus májbetegségek modellezésére, mint a vad típusú egereken végzett vizsgálatok. (Eur. J. Gastroenterology and Hepatology 16:127-133, 2004).

*Az alfafetoprotein expresszió prognosztikus marker humán hepatocelluláris carcinomában.*

Harminchét humán májrakot vizsgáltunk meg immunhisztokémiai módszerrel. A hátrányos prognosztikai markernek tekintett magi P53 pozitivitás, a CD44 expresszió ill. magasabb hisztológiai grade statisztikailag gyakrabban fordult elő a 21 AFP termelő daganatban, mint az AFP negatívokban. Ez utóbbi csoportban viszont gyakoribb volt a kedvező markernek tekintett magi β-catenin pozitivitás. Bár a betegek túlélését nem volt módunk vizsgálni.

Eredményeink alátámasztják azt a korábban elsősorban kísérleti rendszerekben tett megfigyelést, hogy az AFP expresszió kedvezőtlen prognosztikus marker emberi hepatocelluláris carcinomákban. (World J. Gastroenterol 11:5015-5018, 2005).

### **III. A 2002-2006 periódusban kapott egyéb kutatási támogatások**

ETT 240/2001  
ETT 032/2006  
OTKA TS 49 887

### **IV. Nemzetközi együttműködések**

Snorri S, Thorgeirsson Laboratory of Experimental Carcinogenesis, National Cancer Institute, Bethesda MD USA

Hanne Cathrine Bisgaard The Danish Stem Cell Research Centre (DASC), Department of Molecular and Cellular Medicine, The Panum Institute, University of Copenhagen, Dánia

Tadahisa Teramoto<sup>x</sup> Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Kansas University Medical Center, Kansas city KA USA

<sup>x</sup> Ebből az együttműködésből készült közleményre sajnos nem került rá az OTKA támogatás Yano Y, Hayashi Y, Teramoto T, Nakaji M, Nagy P, Ninomiya T, Wada A, Hirai M, Kim S, Seo Y, Yoon S, Kasuga M. Apoptotic pathway related to oval cell proliferation J. Gastroenterol. Hepatol 19:866-872, 2004

### **V. A megjelent közleményekre történt hivatkozások**

Schnur J, Oláh J, Szepesi Á, **Nagy P**, Thorgeirsson SS.: Thioacetamide- induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice  
European Journal of Gastroenterology and Hepatology 16:1-7, 2004  
CIT:7

Shek FW	EUR J GASTRO HEPATOL	16	123	2004
Ding XK	AM J PATHOL	166	1655	2005
Hung KS	BIOCHEM BIOPHYS RES CO	336	324	2005
Avraham Y	NEUROBIOL DIS	21	237	2006
deGouvillle AC	DRUG NEWS PERS	19	85	2006
Wang CH	GENE THERAPY	13	1000	2006
Prosser CC	WORLD J GASTROENTER	12	509	2006

Paku S, **Nagy P**, Kopper L, Thorgeirsson SS.: AAF-dose dependent differentiation of oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies.

Hepatology 39:1353-1361, 2004

CIT: 13

Michalopoulos GK	HEPATOLOGY	41	535	2005
Brooling JT	HEPATOLOGY	41	906	2005
Cimica V	GENOMICS	86	352	2005
Santoni Rugiu E	APMIS	113	876	2005
Sicklick JK	AM J PHYSIOL	290	G859	2006
Nagaya M	HEPATOLOGY	43	1053	2006
Corcelle V	EXP CELL RES	312	2826	2006
Sicklick JH	AM J PHYSIOL	291	G575	2006
Walkap MH	STEM CELLS	24	1833	2006
Fougere-Deschatrette C	STEM CELLS	24	2098	2006
Dudas J	HISTOCHEM CELL BIOL	126	549	2006
Katoonizadeh A	LIVER INT	26	1225	2006
Koenig S	HISTOCHEM CELL BIOL	126	723	2006

Paku S, Dezső K, Kopper L, **Nagy P**.: Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver

Hepatology 2005, 42: 863-870,

CIT: 3

Santoni Rugiu E	APMIS	113	876	2005
Schnater JM	J. HEPATOL	45	377	2006
Dudas J	HISTOCHEM CELL BIOL	126	549	2006

## **VI. A további kutatás tervezett irányai**

Meg szeretnénk vizsgálni, hogy mennyire rendszerspecifikus a primer mitogének regenerációt serkentő hatása, azaz fulmináns májelégtelenség állatkísérleti modelljének kifejlesztése után megvizsgálánk, hogy a regeneráció és az állatok túlélése befolyásolható-e primer hepatocytá mitogénekkal.

Az oválsejtek közvetítésével zajló regeneráció első lépéseit már részletesen jellemeztük.

Arról azonban még nagyon keveset tudunk, hogy az ovális sejtekből kialakuló új, „kis” hepatocyták hogyan szerveződnek májszöveté.

Régi tervünk az AAF/Ph kísérlet során lezajló morfológiai változások összevetése a komplett Solt-Farber hepatocarcinogenezis modellben történetekkel. Első ránézésre a szöveti reakciók nagyon hasonlóak, mégis az egyik modellben az állatok 90%-ban májrák alakul ki, míg a másikban ez sohasem fordul elő. Mikor észlelhető legkorábban különbség és mi az? A fenti kísérletekben a morfológiai vizsgálatokon túl molekuláris biológiai vizsgálatok végzését is tervezzük a pontosabb szabályozási mechanizmusok, klonalitás kérdésének vizsgálatára.

A patkánymájak epeúrendszerének vizsgálata meglepő eredményt hozott, hasonló részletességgel szeretnénk megvizsgálni az ép emberi májban a biliaris rendszert.

Amennyiben sikerül progenitor sejtek részvételével zajló regenerálódó humán májmintákat gyűjtenünk, szeretnénk megvizsgálni az állatkísérletekben tapasztaltakat emberi szövetekben. Vajon minden emberi májban megfigyelhető ductuláris reakció a progenitor sejtszisztéma aktivizálódását jelenti?